

PREPARATION OF ANTIBIOTIC SUBSTANCE* SISOMICIN

Publication number: JP55156593 (A)

Also published as:

Publication date: 1980-12-05

JP61023996 (B)

Inventor(s): FUJII TADAYO; SATO SHIYUJZOU; MUTOO NAOKI; KODAMA AKIRA; KOTANI MASARU +

JP1355900 (C)

Applicant(s): TOYO JOZO KK +

Classification:

- International: A61K35/74; A61P31/04; C12P1/06; C12R1/01; A61K35/66; A61P31/00; C12P1/06; (IPC1-7): A61K35/74; C12P1/06; C12R1/01

- European:

Application number: JP19790060022 19790515

Priority number(s): JP19790060022 19790515

Abstract of JP 55156593 (A)

PURPOSE: To prepare an antibiotic substance, sisomicin, by culturing sisomicin-producing fungi belonging to Dactylosporangium genus. CONSTITUTION: Fungi capable of producing an antibiotic substance, sisomicin, and belonging to Dactylosporangium genus, e.g. Dactylosporangium thailandense G367, are cultured in a conventional cultivation medium at 25-35 deg.C for 100-200hr under aeration, and after adjusting the pH of the cultured medium to acidic range, the medium is neutralized and filtered to obtain the filtrate of the cultivation products. The filtrate is treated with an anion exchange resin, the adsorbed active substance is eluted with 2N aq. ammonia, and the elute is concentrated, adjusted on pH, and treated with an anion exchange resin. The adsorbed material is eluted with aq. ammonia having concentration gradient extending over 0 and 0.35N, and the active fraction is concentrated under reduced pressure, and freeze-dried to obtain the objective antibiotic substance, sisomicin.

.....
Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑭ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55—156593

⑮ Int. Cl.³
C 12 P 1/06
A 61 K 35/74
C 12 R 1/01

識別記号

ADZ

庁内整理番号

6760—4B
6617—4C

⑯ 公開 昭和55年(1980)12月5日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 7 頁)

① 抗生物質シソミシンの製造方法

静岡県田方郡大仁町三福685

② 特 願 昭54—60022

③ 発 明 者 児玉章

④ 出 願 昭54(1979)5月15日

静岡県田方郡函南町平井1900の
3

⑤ 発 明 者 藤井忠代
三島市光ヶ丘15の4

⑥ 発 明 者 小谷勝

⑦ 発 明 者 里井秀三
静岡県田方郡函南町柏谷1277の
28

静岡県田方郡大仁町田京727の
3

⑧ 発 明 者 武藤直紀

⑨ 出 願 人 東洋醸造株式会社
静岡県田方郡大仁町三福632の
1

明 細 書

1. 発明の名称

抗生物質シソミシンの製造方法

2. 特許請求の範囲

(1)ダクタロスポランジウム属に属する抗生物質シソミシン生産菌を培地に培養し、その培養物より抗生物質シソミシンを採取することを特徴とする抗生物質シソミシンの製造方法。

(2)ダクタロスポランジウム属に属する抗生物質シソミシン生産菌が、ダクタロスポランジウム・タイランゲンセ0367である特許請求の範囲第1項記載の抗生物質シソミシンの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、抗生物質シソミシンの新規な製造方法に関する。

従来より抗生物質シソミシンの生産菌としては、ミクロモノスポラ・インヨエンシス〔*Micromonospora inyoensis* (特公昭49—1559号、本国特許第408952B号)〕、ミクロモノスポラ・グリセア〔*Micromonospora grisea* (特公昭48—

—52991号)〕、ミクロモノスポラ・ジオネンシス〔*Micromonospora gionensis* (特公昭49—55895号、米国特許第4001209号)〕、ミクロモノスポラ・バリエタス・エグレスセンシス〔*Micromonospora var. nigrescens* (ハンガリー国特許第16877B号、J. Antibiot. 3, 9: 945 (1977))〕が知られていた。このように、抗生物質シソミシン生産菌はすべてミクロモノスポラ属〔*Micromonospora*〕に属するものであり、その形態的特徴は基生菌糸に一個づつ胞子を形成するものであり、さらにミクロモノスポラ属は、ミクロモノスポラ科〔*Micromonosporaceae*〕に属する〔*Bergey's manual of determinative bacteriology* 第8版 (1974)〕ものであつた。

本発明者らは、静岡県富士市の畑土壌より分離した放線菌567が抗生物質シソミシンを生産することを見出し、培養する通り、放線菌567がダクタロスポランジウム属〔*Dactylosporangium*〕に属するもので、その形態的特徴は基生菌糸に胞

子のうを着生し、胞子のう中に鞭毛を有する胞子を形成するもので、さらにこのダクトロスポランジウム属はアクチノプラネス科 (Actinoplasmaceae) に属するもので、従来のミクモノスポラ属とは分類学上、明らかに科の段階での相違が認められる抗生物質シンシニンの新規な生産菌であることを見い出した。

上記放線菌6367の肉眼的および顕微鏡的観察に基づく各種培地上における特徴は、次の通りであつた。

(1) 形態的性状

リンゴ酸カルシウム寒天培地 [Bact. Rev. 2: 1 (1957)] 上、30℃、5-7日間培養し、観察した所見は次の通りである。

基生菌糸は直線状または屈曲状で、分枝をなし、伸長し、分断はせず、直径0.5-0.8μであり、気菌糸は形成しない。

基性菌糸に、大きさ1.5-2.0×2.0-2.5μの球状または棒状物体の着生が、寒天培地中に埋つた状態でみられる。

- 3 -

基生菌糸より短かい胞子のう柄を生じ、胞子のうは指形で、寒天培地表面上に、1個または房状に形成する。胞子のうの大きさは、1.0-1.5×4.0-6.5μで、中に3-4個の胞子がたてに1列に入っている。

胞子は水中で運動性があり、形は球形、楕円形または梨形を呈し、大きさは1.0-1.5×1.5-2.5μであり、極性で房状の鞭毛を有している。

(2) ジアミノピメリン酸組成

全菌体分析によるジアミノピメリン酸は、ノゾー型およびノゾー型よりR_m値の低いもの (arising diaminopimelic acid) が検出された。

(3) 各種培地における生育状態等

各種培地上で、30℃、14日間培養し、観察した所見は次の通りであり、オート・ミール寒天培地上で未発育の気菌糸がわずかに形成される以外は、気菌糸の形成は認められず、また胞子のうはリンゴ酸カルシウム寒天培地上で良好、土壌寒天培地 [J. gen. Microbiol. 5: 295 (1968)] 上で、中程度であり、その他の培地上

- 4 -

ではわずかに、またはほとんど形成されなかつた。

なお、色の表示は、カラー・ハーモニー・マニュアル (Color Harmony Manual) 第4版1958年 (Container Corporation of America) による色の分類に従つたものである。

各種培養上における生育状態等

培 地	生 育	基 生 菌 糸 の 色	可 溶 性 色 素
シロタロー・ス・無菌培養天培地 (ワックスマン培地№1)※	中程度ないし不良	アブリコット(Apricot(41e))ないしダスティ・オレンジ (Dusty Orange(41c))	な し
グルコース・アス・パラザン寒天培地 (ワックスマン培地№2)※	不 良	ブライト・メロン・イエロー(Brite Melon Yellow (31a))ないしアブリコット(41e)	“
グリセリン・アス・パラザン寒天培地 (ISP培地5)※※	僅少ないし不良	無色ないしライト・メロン・イエロー(Light Me lon Yellow(31a))	“
スターチ・無菌培養天培地 (ISP培地4)※※	中程度ないし良好	ルセツト・オレンジ(Russet Orange(4nc))ないし ダスティ・オレンジ(41c)	“
デロゲン寒天培地 (ISP培地7)※※	僅少ないし不良	アブリコット(Apricot(4ga))ないし・パステル・オレンジ (Pale Pastel Orange(41c))	“
オート・ミール寒天培地 (ISP培地3)※※	中程度ないし良好	オレンジ・ラスト(Orange Rust(4pe))ないし ルセツト・オレンジ(Russet Orange(4nc))	“
イースト・コクス・炭素・エクス寒天培地 (ISP培地2)※※	“	メイプル(Maple(41e))ないしルグヅ・タン (Lugzu Tan(4ue))	メイプル(41e)ないしライト・ ブラウン(Light Brown (4ng))
リンゴ酸カルシウム寒天培地	不 良	無 色	な し
保菌寒天培地 (ワックスマン培地№14)※	僅 少	“	“

- 6 -

ベネット寒天培地 (ワックスマン培地№30)※	中程度ないし良好	メイプル(41e)ないしルグヅ・タン(4ue)	メイプル(41e)ないしライト・ブラウン (4ng)
エマーソン寒天培地 (ワックスマン培地№28)※	中 程 度	パステル・オレンジ(41c)ないしメイプル(41e)	メイプル(41e)
ハイキ・トレスナー寒天培地 (ワックスマン培地№32)※	中程度ないし良好	シナモン(Cinnamon(51e))ないしメイプル(41e)	メイプル(41e)ないしライト・スパイス・ ブラウン(Light Spice Brown(41p))
グルコース・イースト・エクス寒天培地 (ワックスマン培地№29)※	中 程 度	メロン・イエロー(Melon Yellow(3ga))	な し
ペプトン・イースト・エクス寒天培地 (ISP培地6)※※	僅 少	無 色	“
土壌寒天培地	僅少ないし不良	“	“
ジャガイモ片 (ワックスマン培地№40)※	中 程 度	タイルレッド(Tile Red(5ne))ないし銅 (Copper(51e))	“
ジャガイモ片+炭酸カルシウム	“	“	“
ニンジン片	僅 少	無 色	“

- ※ Wakeman, S. A. "The Actinomycetes" Vol. 2, 1961 p.327-334 Williams & Wilkins co.
 ※ Inter. J. Syst. Bact. 16: 313-346 (1966)
 ※ Antimicrob Agents and Chemother. 1963 p. 116 ~ 124

- 7 -

(N) 生理的性状

生理的諸性状は下記の通りである。

1) 炭素源の同化性

炭素源	P & G [※]	Sh ^{※※}
D-アラビノース	±	+
L-アラビノース	+	+
D-フラクトース	+	+
D-ガラクトース	+	+
D-グルコース	+	+
グリセロール	—	—
L-イノシトール	—	—
D-マンノース	+	+
D-マンニトール	+	+
α-メリピオース	+	+
β-ラクトース	+	±
ズルニトール	—	—
D-トレハロース	+	+
D-セロビオース	+	+
メレシトース	+	+
ラフィノース	+	—

L-ラムノース	+	+
D-リボース	—	—
L-フルボース	—	—
D-フルピトール	—	—
シュクロース	+	+
D-キシロース	+	+
アデニトース	—	—
ザリシン	±〜+	±〜+
スターチ	+	+
マルトース	+	+
デキストリン	+	+
イヌリン	—	—

+: 陽性, ±: 疑陽性, —: 陰性

※: アリドハム・ゴットリーブの無機培地

※※: Inter. J. Syst. Bact., 21: 248-2

47 (1971) によるルエドマンの有機

培地

2) 生育温度範囲: 20〜40℃

3) 脱脂牛乳: ペプトン化および凝固とともに陽性

— 5 —

— 9 —

4) メラニン棕色素の生産: 陽性 (チロシンおよびペプトン・イーストエキスを鉄源培地上)

5) スターチの加水分解: 陽性

6) セルロースの分解: 陽性

7) カゼインの分解: 陽性

8) チロシンの分解: 陽性

9) セラチンの消化: 陽性

10) 強化要素の生成: 弱い陽性

11) 硝酸塩の還元: 陽性

12) 生育pH: pH 5.5〜9.0

上記の通り、本菌G367の特徴としては、革生菌系に振形の胞子のうを産生し、胞子のう中に胞子がたてに一列に並び、胞子に扇状の鞭毛を有していることである。

このように、胞子のうを形成し、その中に鞭毛を有する胞子を形成するものは、アクチノプラネス科 (Actinoplanaceae) に属するものであつて、胞子のうが振形で、その中にたてに一列に胞子が形成されるものは、ダクテロスポランジウム属に属する。

さらに、本菌G367は有機培地上で、蒸生菌系が褐色色ないし褐色を呈し、褐色の可溶性色素を生ずる特徴を有することより、ダクテロスポランジウム・タイランデンセ (*Dactylosporangium thailandense*) [Arch. Microbiol., 58: 42-52 (1967)] に属するものと同定した。

よつて、本菌G367を、ダクテロスポランジウム・タイランデンセG367と命名したものであつて、また本菌は工業技術院微生物工業技術研究所に「申請受理番号第4840号」として申請したものであつた。

本発明は上記の知見に基づいて完成されたもので、ダクテロスポランジウム属に属する抗生物質シソミシン生産菌を培地に培養し、その培養物より抗生物質シソミシンを採取することを特徴とする抗生物質シソミシンの製造方法である。

次いで、本発明の抗生物質シソミシン（以下、シソミシンという）製造するにあつて例示すれば、上記のダクテロスポランジウム属に属するシソミシン生産菌を通常の微生物の培養に使用する培地

— 10 —

— 11 —

成分を含む培地に好強的に培養することによつて得られる。培地としては、固形培地または液体培地が用いられるが、特に大衆生産のためには液体培地、特に水性培地が適当である。

培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては同化可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、シュクロース、マルトース、スターチ、デキストリン、麦芽糖などが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばコーン・ステープ・リカー、大豆粉、綿実粉、小麦グルテン、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、アンモニウム塩、硝酸塩などが使用される。その他、リン酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、ナトリウム、コバルト、鉄、マンガンなどの塩類が必要に応じて使用される。

培養温度は菌が発育し、シソミシンを生産する範囲内で適宜変更し得るが、特に好ましくは25〜35℃である。培養時間は、条件によつて多少

— 12 —

異なるが、通常100〜200時間程度であつて、シソミシンが最高力価に達する時期を見計つて適當な時期に培養を終了すればよい。

このようにして得られたシソミシン生産菌の液体培養の培養物中において、シソミシンは液体部分に大部分産出されている。

次いでこのシソミシン生産菌の培養物からシソミシンを採取するのであるが、シソミシンは水溶性の極弱性アミノ糖化合物であることを利用して分離精製を行なうことが簡便である。また生産されたシソミシンはバチルス・ズブチリスPC1219を接菌として、通常の寒天板法により活性区分の確認、および定量を行なつたものである。

シソミシンの分離精製手段の一例を示すと次の通りである。すなわちシソミシン生産菌を前述の如く培養して得られる培養物から固形部分を除去して培養液を得るのであるが、シソミシンがアミノ糖化合物であるためにその培養物のpHを一旦強性に調整し、これを中和して濾過してその培養液を得ることが好ましく、次いでこの培養液

— 13 —

を陽イオン交換樹脂例えばアンバーライトMB3-5(B(NH₄⁺型)のカラムにチャージせしめて吸着せしめ、これにより活性物質を2Nアンモニア水にて溶出せしめ、さらにその溶出液を濃縮した後、そのpHを調整し、陽イオン交換樹脂例えばCM-セフアデックスC-25(NH₄⁺型)のカラムにチャージせしめて吸着せしめ、0〜0.35Nの濃度勾配をもたせたアンモニア水にて溶出せしめ、その活性成分を得、これを減圧濃縮し、凍結乾燥することによりシソミシンの精製白色粉末を遊離塩基の型にて得られる。またこの様にして得られるシソミシンは薄層クロマトグラフィーにて単一スポットを示すものであることが簡便に示し得る。

このようにして得られた本発明のシソミシンの物理化学的性質を例示すれば次の通りであり、公知のミクロモノシラ菌に属するシソミシン生産菌の産生する公知化合物なるシソミシンと一致した。

(1) 分子量

447 (マススペクトルより)

(2) 元素分析

C = 49.59%, H = 8.93%, N = 14.75%

(3) 比旋光度

$[\alpha]_D^{25} = +18.4^\circ$ (C = 0.5, H₂O)

(4) 紫外吸収スペクトル

210〜400mμの領域において、吸収極大はなし。

(5) 溶解性

水に易溶、メタノールに微溶、クロロホルムに難溶、酢酸エチル、アセトン、ベンゼンに不溶。

(6) 呈色反応

レミュー反応、ニンヒドリン反応、
坂口反応、塩化第一鉄反応、モリーッシュ反応

(7) R_f値：シリカゲル(メルク社製、カークセルゲル60)

クロロホルム：メタノール：濃アンモニア水
1：1：1の下層 R_f = 0.44

(8) 酸塩基の区別

— 15 —

— 14 —

培養性物質

(9) 抗菌スペクトル (MIC₉₀)

スタフィロコッカス・アウレウス ATCC 6538P	< 0.2
スタフィロコッカス・アウレウス M527	< 0.2
スタフィロコッカス・エピデルミシス 68-1-1	< 0.2
ストレプトコッカス・ゾロゲニス NY5	1.4
サルモネラ・ルテア ATCC 9341	1.6
コリネバクテリウム・ジフテリアエ PBS	< 0.2
エシェリヒア・コリ-NIH1	0.8
シトロバクター・フロインダイ GN546	0.8
クレブシエラ・エウモニア ATCC 10033	0.4
サルモネラ・エンテリタイシス・デホルトネリ	0.4
シゲラ・ノンネ E33	0.8
エンテロバクター・アエロゲニス D655	0.4
シヌードモナス・エルカノーサ ML4541	0.8

これらの結果より、本発明にて得られた化合物が前記の刊行物記載のシゾミシンと同一物質であると認められた。

次に本発明の実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明はこれにより何ら限定されるもので

- 16 -

はない。

実施例 1

デキストリン 1%、グルコース 1%、カゼイン水解物 0.5%、酵母エキス 0.5%、炭酸カルシウム 0.1% を含有する培地 (pH 7.0) 100 ml を 500 ml 容三角フラスコに分散し、120℃、20 分間加熱殺菌した。本培地 10 本に、各々テトラソランジウム・タイランゲンセ G567 株の斜面培養液よりの白金耳を接種し、30℃、120 時間振盪培養した。次いでこれを上記と同組成の加熱殺菌した培地 20 ml を含有する 30 ml 容ジャーファーマンターに移植し、30℃、72 時間、300 rpm、毎分 20 l の無菌空気の条件下で通気攪拌培養した。次いでデキストリン 5%、グルコース 0.5%、脱脂大豆粉 3%、炭酸カルシウム 0.7%、塩化コバルト 1.5 ppm を含有する加熱殺菌した培地 (pH 7.2) 200 ml を含有する 250 l 容タンクに上記の培養物 10 l を移植し、30℃、120 時間、250 rpm、毎分 100 l の無菌空気の条件下で通気攪拌培養し

- 17 -

培養物約 190 l を得た。

次いで、実施例 2 の如くして、その培養物よりシゾミシンを分離精製するものである。

実施例 2

実施例 1 で得られた培養物を、1.2 N 磷酸水溶液にて pH 2 に調整し、30 分間攪拌した後、濃アンモニア水にて pH 7.0 に調整し、さらにこれに活性炭としてバーライト (商品名) 4 g を加えて過濾し、次いで得られた培養液を、アンバーライト (RC-50 コーラム・アンド・パーツ社製) (NH₄⁺型) 10 l を充填したカラムにチャージし、水洗した後、2 N アンモニア水 20 l にて溶出せしめ、その全溶出液を得、これを 100 ml まで減圧濃縮した。

次いでこの濃縮液を 6 N 磷酸水溶液にて pH 7.0 に調整し、これを、CM-セプアックス G-25 (ファルマシア・ファイン・ケミカル社製) (NH₄⁺型) 500 ml を充填したカラム (径 4 cm) にチャージして活性物質を吸着せしめた。その後該カラムを水洗後、0.55 N の濃度勾配

- 18 -

をもたせたアンモニア水 5 l により溶出せしめ、溶出液を 20 ml ずつ分画した。各分画について、クロホルム：メタノール：28% アンモニア水 = 1:1:1 の下層を脱脂溶液とした薄層クロマトグラフィーを行ない、ニンヒドリン発色により目的物を確認した。その結果、第 210 画分より 228 画分がシゾミシンのみを含有したものであった。次いでこの画分を回収、合せて減圧濃縮し、次いで減圧乾燥してシゾミシン 2.1 g を得た。

特許出願人 東洋醸造株式会社

代表者 伊東 富士雄

- 19 -

手 続 補 正 書

昭和55年2月 / 日

特許庁長官 川 原 龍 雄 殿

1. 事件の表示

昭和54年特許第60022号

2. 発明の名称

抗生物質シソミシンの製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 静岡県田方郡大仁町三浦632の1

名称 東 洋 薬 造 株 式 会 社

代表者 伊 東 富 士 氏

4. 補正命令の日付

日 期

5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の

6. 補正の内容

明細書第2頁第3行～4行の

「ミクロモノスポラ・バリエタス・ニグレスセン
ス」を

「ミクロモノスポラ・ブルブレア・バリエタス・

ニグレスセン」を訂正する

同第2頁第5行の

「Micromonospora var. nigrescens」を

「Micromonospora purpurea var. nigrescens

」と訂正する

同第4頁第12行の

「diaminopimelic」を

「diaminopimelic」と訂正する

同第4頁第17行の

「I. gen. Microbiol.」を

「I. gen. Microbiol.」と訂正する

同第5頁第6行の

「セフアデックスB」を

「セフアデックスC」と訂正する

修正ノモダ